



Máster Investigación y Avances en
Inmunología molecular y celular
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina
"López-Neyra" CSIC

IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPES CD8+ EN LA PROTEÍNA PFR1 DE *LEISHMANIA INFANTUM* Y DETERMINACIÓN DE SU INMUNOGENICIDAD COMO VACUNA PLASMÍDICA

Directores de tesina: Dr. Manuel Carlos López López
Dra. M^a Carmen Thomas Carazo
Dra. Concepción Marañón Lizana

Tutora Académica: Dra. Ana Abadía Molina

Línea de Investigación: Modulación de la respuesta Inmune
Alumno: Darién Ledesma Arroyo
D.N.I. 74734675-Q

Granada 17 de diciembre de 2010

ÍNDICE

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 <u>Leishmaniosis</u>	1
1.2 <u>Ciclo de vida y manifestaciones clínicas</u>	2
1.3 <u>Respuesta inmunológica frente a <i>Leishmania infantum</i></u>	3
1.3.1 <u>Linfocitos T CD8+ en la leishmaniosis</u>	5
1.4 <u>Proteínas paraflagelares</u>	5
1.5 <u>Acción adyuvante de las proteínas de choque térmico</u>	6
1.6 <u>Vacunas de DNA</u>	6
2. <u>OBJETIVOS</u>	8
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	9
3.1 <u>Infección experimental, obtención y análisis de órganos</u>	9
3.2 <u>Inmunización experimental</u>	10
3.3 <u>Péptidos</u>	10
3.3.1 <u>Ensayo de unión a células T2</u>	11
3.4 <u>Purificación de la proteína recombinante PFR1</u>	11
3.5 <u>Determinación de la respuesta citotóxica antígeno-específica mediante ensayos de ELISPOT</u>	12
3.6 <u>Determinación del nivel de anticuerpos antígeno-específicos mediante la técnica de ELISA</u>	13
4. <u>RESULTADOS</u>	14
4.1 <u>Selección de péptidos con motivo de unión a HLA-A*0201</u>	14
4.1.1 <u>Afinidad de unión al HLA-A*0201</u>	15
4.2 <u>Inmunización experimental de ratones A2/K^b</u>	15
4.2.1 <u>Purificación plásmidos para inmunizaciones</u>	16
4.2.2 <u>Expresión y purificación de la proteína PFR1 de <i>L. infantum</i></u>	16
4.2.3 <u>Respuesta humoral en ratones A2/K^b inmunizados</u>	18
4.2.4 <u>Respuesta CTL en ratones A2/K^b inmunizados</u>	19
4.3 <u>Infección experimental de ratones A2/K^b</u>	20
4.3.1 <u>Carga parasitaria en ratones infectados</u>	20
4.3.2 <u>Respuesta CTL en ratones A2/K^b infectados</u>	21
5. <u>DISCUSIÓN</u>	22
6. <u>CONCLUSIONES</u>	24
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	25

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad que amenaza a unos 350 millones de personas, en 88 países diferentes. Se estima en unos 12 millones los infectados actualmente y de 1 a 2 millones los nuevos casos por año (OMS, 2010). Se habla de estimación porque la enfermedad no es de declaración obligatoria en todos los países endémicos. Las principales zonas endémicas son la cuenca mediterránea, América latina y oriente medio (Fig 1). Por tanto, en torno a una décima parte de la población mundial está en riesgo de ser infectada.

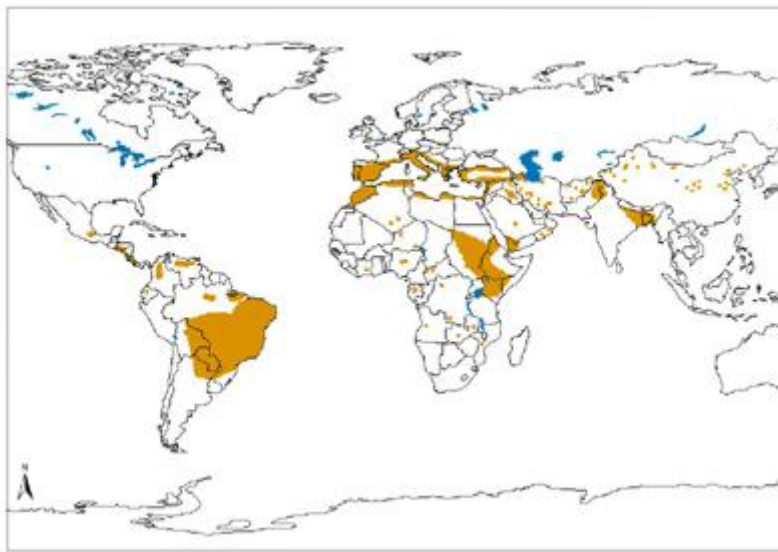


Figura 1: Distribución geográfica de la leishmaniosis visceral. OMS, octubre 2010.

La leishmaniosis está causada por diferentes especies del protozoo parásito del género *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatide). A pesar de la alta similitud morfológica entre las diferentes especies del género, éstas causan diferentes cuadros patológicos en los seres humanos. A grandes rasgos, se distinguen tres grandes tipos de patología: Cutánea, mucocutánea y visceral. Así, *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum* son causantes de leishmaniosis visceral mientras que *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana* o *Leishmania major* causan la variante cutánea.

Las diferentes manifestaciones clínicas dependen de los órganos que se afectan. De esta forma, la variedad cutánea de la enfermedad queda recluida en la piel y es la forma más común y menos grave de la enfermedad, aunque la lesión se prolonga en el tiempo y deja cicatriz permanente antes de curar espontáneamente. En cuanto a la variedad mucocutánea, tiene menos tendencia a la cura espontánea y provoca lesiones desfigurantes, dado que afecta a las mucosas (tabique nasal, boca, laringe), aunque su tasa de mortalidad no es elevada. La

forma más grave de la enfermedad es la visceral, que afecta a órganos vitales y ocasiona la muerte del paciente si no es tratada a tiempo. (OMS, 2010). Se estima hay unos 500 000 nuevos casos de leishmaniosis visceral al año, con más de 50 000 muertes anuales (*Chappuis, Sundar et al. 2007*).

La especie causante de leishmaniosis en España es *L. infantum*. La distribución geográfica de esta especie se sitúa en la cuenca mediterránea y Asia. Como ya se había indicado, *L. infantum* es causante de la variedad visceral de la enfermedad. El principal hospedador es el perro, actuando como reservorio de la enfermedad en humanos (*Alvar et al. 2004*). Su incidencia en los últimos años está aumentando debido al aumento de individuos inmunosuprimidos y a la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (*Ready 2010*). No se suelen producir lesiones en el sitio de la infección y los primeros síntomas comienzan a aparecer tras un tiempo de incubación de 4 a 10 meses. Las principales manifestaciones de la enfermedad son cefaleas, hepatomegalia, esplenomegalia, fiebre, astenia, diarrea, anemia, dolor abdominal, leucopenia, caquexia, trombocitopenia, hipergammaglobulinemia, hipoalbuminemia y activación policlonal de células B (*Herwaldt 1999; Kaye, Svensson et al. 2004; Chappuis, Sundar et al. 2007*).

El tratamiento frente a la enfermedad se basa en la administración de derivados antimoniales pentavalentes como el estibogluconato sódico (Pentostam®) o el antimonio de meglumina (Glucantime®) que inhiben enzimas glucolíticas o implicadas en la β -oxidación. Los fármacos de segunda generación son la anfotericina B, pentamidina, alopurinol, azoles e inmunomoduladores como el interferón gamma recombinante. Aunque efectivos en la mayoría de los casos, todos estos tratamientos resultan muy costosos y presentan numerosos efectos adversos, amén de la aparición cada vez más frecuente de casos de resistencia. Así, estas deficiencias de los quimioterapéuticos, unidas a la inexistencia de ningún método profiláctico eficaz, hacen necesaria la búsqueda de una vacuna efectiva y segura (*Alvar, Yactayo et al. 2006; Piscopo and Azzopardi 2007*).

1.2 Ciclo de vida y manifestaciones clínicas

El ciclo de vida del parásito es complejo pues requiere dos hospedadores, uno invertebrado y otro vertebrado (Fig 2). Los hospedadores invertebrados son insectos pertenecientes al género *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo). Por su parte, el hospedador vertebrado es un mamífero, entre ellos, el hombre, aunque hay alguna especie capaz de infectar reptiles. El parásito adopta dos estadios morfológicos principales a lo largo de su vida, promastigote, forma flagelada con dos subtipos, procíclico y

metacíclico y forma amastigote intracelular, no flagelado. Este parásito infecta los macrófagos del hospedador mamífero (Alexander and Russell 1992). El promastigote metacíclico procedente de la probóscide del insecto vector es la forma infectiva capaz de infectar macrófagos dentro de los cuales se diferencia a amastigotes que sobreviven en los fagolisosomas de los mismos y se replican hasta hacerlos estallar. Al picar al mamífero el insecto succiona estos amastigotes, que se diferencian, ya en el vector, a promastigotes procíclicos.

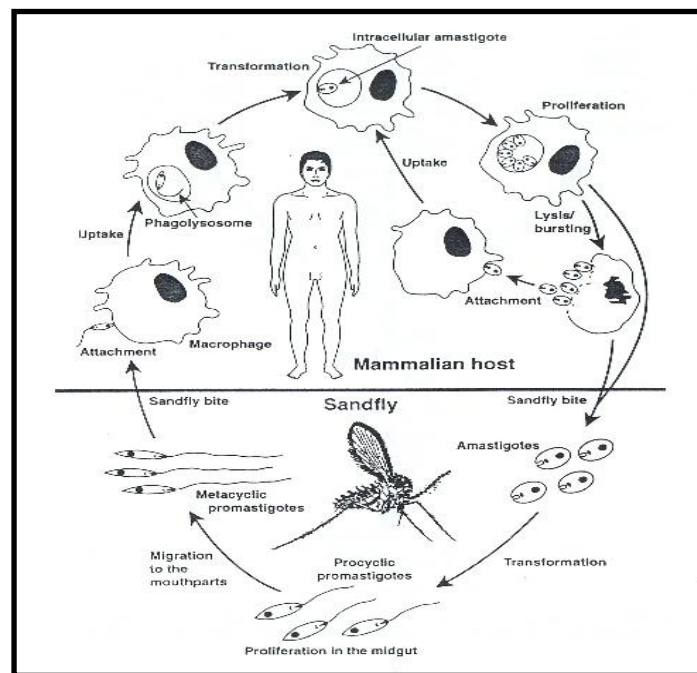


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Evolución de las diferentes formas del parásito. (Handman 1999)

1.3 Respuesta inmunológica frente a *Leishmania infantum*

La respuesta inmunológica desarrollada en respuesta a la infección por *L. infantum* se desarrolla principalmente en el hígado y el bazo. Mientras que el primero es el órgano donde ocurre la infección aguda, tras el aclarado parasitario (con mínimo daño tisular y resistencia a la reinfección), el bazo se convierte en un lugar de persistencia parasitaria (Stanley and Engwerda 2007).

La primera barrera inmunitaria que tiene que superar el parásito antes de llegar a estos órganos es la inmunidad innata. *Leishmania* ha desarrollado unos sistemas que le permiten ser resistente a estos mecanismos. Así, su densa capa de lipofosfoglicanos y su metaloproteasa de superficie gp63 protegen al promastigote del ataque por el sistema del complemento humano (impiden la fijación a la membrana de C3b y la gp63 lo escinde a C3bi),

y también permiten al promastigote diferenciarse a amastigote y sobrevivir al pH ácido y a las enzimas líticas a las que es expuesto en el interior de estos macrófagos (Cunningham 2002). Además, estos lipofosfoglicanos también protegen al parásito de los radicales del oxígeno producidos por el macrófago para intentar destruirlo.

La gran función del macrófago es la de actuar como célula presentadora de antígeno a las células T y favorecer la diferenciación de éstas hacia un perfil Th1, caracterizado por la producción de citocinas como interferón- γ (IFN γ). El parásito inhibe esta diferenciación por dos vías: por una parte los lipofosfoglicanos y los glicoinositolfosfolípidos inhiben la transcripción del gen codificante de la interleuquina-12 (IL-12), uno de los principales inductores de la respuesta Th1; y por otra, activan la producción de IL-10 (citocina reguladora) mediante la unión de amastigotes opsonizados con IgG a los receptores Fc γ R del macrófago (Kane and Mosser 2001).

Se postula que la respuesta Th1 está asociada a la superación de la enfermedad (Sacks and Anderson 2004). Esta respuesta se caracteriza por la producción de IFN- γ , TNF- α (Kaye, Svensson et al. 2004) y entre sus principales efectos está la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que produce óxido nítrico en el interior del macrófago hasta conseguir aclarar esta carga parasitaria. No obstante, una temprana activación de la respuesta Th2, con producción de IL-4 e IL-10, se relaciona con el avance de la enfermedad por la supresión de la respuesta Th1 (Sacks and Anderson 2004).

Hasta la fecha, se ha relacionado la resistencia a la infección por este protozoo parásito con una respuesta inmunológica tipo Th1. Tanto es así, que los principales modelos animales para la leishmaniosis son las cepas de ratón C57BL/6 y BALB/c precisamente por el sesgo en su respuesta inmunológica hacia Th1 y Th2, respectivamente. Los ratones BALB/c presentan una rápida respuesta tipo Th2 (con liberación de IL-4, IL-13 e IL-10), siendo susceptibles a padecer la enfermedad, mientras que los ratones de la cepa C57BL/6 carecen de esta activación rápida de tipo Th2 y las Treg no comprometen la respuesta Th1, con lo que tienen una respuesta Th1 normal y consiguen controlar la infección (Sacks and Noben-Trauth 2002; Uzonna, Joyce et al. 2004).

En cuanto a la respuesta en humanos, durante la infección con *L. infantum*, se detecta una respuesta intermedia mixta Th1 y Th2 (Coutinho, Oliveira et al. 1996; Smith, Whitesell et al. 1998; Minodier, Piarroux et al. 1999; McMahon-Pratt and Alexander 2004; Carrillo and Moreno 2009; Carson, Quinnell et al. 2010). Por lo tanto, una vacuna eficaz deberá generar una activación rápida de células T de fenotipo mixto, aunque sesgado hacia el fenotipo Th1 (Rosa et al., 2007; Ramos et al., 2008) seguida de una fuerte respuesta citotóxica específica, acompañada de la producción de anticuerpos neutralizantes del subtipo IgG2a también

específicos (Kaye, Svensson et al. 2004; Sacks and Anderson 2004; Bourdoiseau, Hugnet et al. 2009).

1.3.1 Linfocitos T CD8+ en la leishmaniosis

Tanto los linfocitos T CD4+ como CD8+ son necesarios para conseguir resistencia a la infección. Se ha descrito que los linfocitos T CD4+ juegan un papel clave en el control del crecimiento parasitario hepático en la fase primaria de la infección, mientras que los CD8+ lo son para el control de la fase posterior de la infección (Stanley and Engwerda 2007).

La activación de los linfocitos CD8+ es dependiente de la presentación de péptidos de 9 ó 10 aminoácidos de longitud unidos al MHC de clase I que sean reconocidos por el TcR de estos linfocitos. Esta activación desencadena la respuesta linfocitaria basada en la respuesta citotóxica y la secreción de citocinas. Dentro de este papel secretor, pueden diferenciarse hacia dos perfiles, Tc1 y Tc2 (Woodland and Dutton 2003). Una gran evidencia de la importancia de los linfocitos T CD8+ en el control de la infección parasitaria por *Leishmania* la constituye el hecho de que el bloqueo del receptor B7-H1, cuya ruta está implicada en la inducción de apoptosis y en la supresión de la proliferación de los linfocitos T CD8+, reduce significativamente la carga parasitaria esplénica en ratones infectados (Joshi, Rodriguez et al. 2009)

Todos estos datos demuestran la gran importancia de los linfocitos T CD8+ en el control de la carga parasitaria. También se han reportado numerosos experimentos cuyos resultados permiten relacionar la protección a largo plazo con la activación de estos linfocitos T CD8+. Por ejemplo, las vacunas basadas en proteínas recombinantes para *Leishmania major* en ratones BALB/c consiguen una protección parcial la cual es completamente dependiente de la activación de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ (Rafati, Kariminia et al. 2002). Por tanto, en la búsqueda de nuevas vacunas frente a *Leishmania* resulta esencial la identificación de antígenos capaces de activar a los linfocitos CD8+ (citotóxicos) y de modular la respuesta hacia el fenotipo Th1.

1.4 Proteínas paraflagelares

Las proteínas paraflagelares (PFR) son exclusivas de kinetoplastidos, euglenoides y dinoflagelados (Maga and LeBowitz 1999), y forman una estructura que se sitúa a lo largo del flagelo sobre una de las caras del axonema. En tripanosomátidos, estas PFRs se han agrupado en dos subfamilias dependiendo de su peso molecular. En el caso de *Leishmania*, se denominan PFR1 y PFR2. Estas proteínas se encuentran altamente conservadas dentro de los

tripanosomátidos, a pesar de la divergencia filogenética de las especies implicadas. Se ha comprobado la capacidad inmunogénica de estas proteínas en otros tripanosomátidos (*Morell, Thomas et al. 2006*), así como en otras especies del mismo género *Leishmania* (*Saravia, Hazbón et al. 2005; Carrillo and Moreno 2009*). Además, en *Trypanosoma cruzi*, se ha comprobado que estas PFRs son capaces de generar una respuesta de linfocitos T CD8+ (*Wrightsmann, Luhrs et al. 2002*). Sin embargo, por el momento se desconoce si las PFRs de *L. Infantum* son también antígenos CD8 inmunodominantes o inmunoprotectores.

1.5 Acción adyuvante de las proteínas de choque térmico

Otras proteínas inmunogénicas interesantes son las proteínas de choque térmico de alto peso molecular. Ésta familia de proteína de tamaño heterogéneo están altamente conservadas entre las diferentes especies (eucariotas y procariotas). Las mismas son fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis celular por su papel de chaperonas (*Smith, Whitesell et al. 1998*). En cuanto a su papel inmunológico, resultan muy interesantes por su capacidad de activación del sistema inmunitario. Concretamente, es destacable la familia Hsp70 por su versatilidad inmunológica. Por ejemplo, la Hsp70 de diferentes organismos ha mostrado ser capaz de activar la respuesta inmune frente a una proteína antigénica a la que se acopla. Concretamente, la Hsp70 de *T. cruzi* ha resultado ser capaz de generar una respuesta específica frente a la proteína KMP11 cuando se realiza una inmunización con un vector vacuna que porta las secuencias de ambas proteínas, activando la producción de IgG2a específicas frente a la KMP11 (*Planelles, Thomas et al. 2001*). Además, los ratones inmunizados con dicho vector vacuna y no los inmunizados con el vector portador de la secuencia codificante de sólo la KMP11, generan una respuesta citotóxica específica frente a la KMP11.

1.6 Vacunas de DNA

Las vacunas genéticas se basan en la administración de un plásmido portador de la secuencia codificante de la/s proteína/s frente a la/s que queremos generar una respuesta inmunológica. Presentan una serie de ventajas con respecto a las vacunas clásicas, como aquellas basadas en patógenos atenuados o muertos o las vacunas recombinantes, como son su bajo coste y su alta especificidad, plasticidad y estabilidad. Además, son especialmente interesantes frente a *L. Infantum* porque generan una fuerte respuesta citotóxica y Th1. El plásmido tiene dos partes fundamentales, la necesaria para la transcripción (promotor, siendo

el más utilizado el del citomegalovirus, y una señal de poliadenilación) y unas secuencias inmunoestimuladoras (ISS) que consisten en motivos citosina-guanina no metilados. Estas ISS han sido ampliamente estudiadas y se ha comprobado que son capaces de generar una fuerte respuesta inflamatoria de tipo Th1 (Jakob, Walker et al. 1998; Sparwasser, Koch et al. 1998) y de activar a las células dendríticas (Hartmann, Weiner et al. 1999). No se conoce con exactitud cómo es el mecanismo por el que, utilizando estos plásmidos, se consigue una respuesta inmunológica, aunque todo parece indicar que son las células de Langerhans las encargadas de procesar estos plásmidos y presentar los antígenos correspondientes a las células inmunitarias (Méndez, Belkaid et al. 2002).

Son numerosas las vacunas genéticas que se han ensayado frente a *Leishmania* en el modelo del ratón utilizando diferentes antígenos como gp63, PSA-2 o LACK. La más estudiada es la que utiliza la secuencia de LACK y se ha comprobado que en una posterior infección dirige la respuesta hacia Th1 y que es capaz de activar células T CD8+ (Gurunathan, Prussin et al. 1998; Kedzierski, Zhu et al. 2006). No obstante, esta vacuna no ha resultado ser capaz de generar protección frente a la leishmaniosis visceral, limitando su uso sólo para la leishmaniosis cutánea (Melby, Yang et al. 2001; Kedzierski, Zhu et al. 2006). Para la forma clínica más grave se han conseguido protecciones parciales con el antígeno A de *L. donovani* (Ghosh, Zhang et al. 2001); con histonas (Melby, Ogden et al. 2000); y con la gamma-glutamylcisteína sintetasa, la cual incrementa el nivel de CD3+ CD4+ en el bazo, así como la producción de IgG1 e IgG2a (Carter, Henriquez et al. 2007). Por último, se han realizado estudios con una vacuna que combina KMP11, gp63, LACK y TRYP en perros, aunque en este caso tampoco se observó capacidad protectora frente a la infección por *L. infantum* (Rodríguez-Cortés, Ojeda et al. 2007).

2.- OBJETIVOS

La respuesta celular (CD8+/CTLs) y humoral (tipo Th1) es fundamental en el control e inmunoprotección frente a la leishmaniosis. Por tanto, nuestro interés se centra en la caracterización de esta respuesta inmune, usando para ello un modelo de experimentación murina basado en la utilización de ratones transgénicos C57BL/6-A2K^b y plásmidos DNA.

Los objetivos son, por tanto:

- Identificar epítopes CD8+ restringidos al HLA-A*0201 en la secuencia de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum*, utilizando un modelo de infección murino.
- Caracterizar la respuesta inmunológica conseguida en un modelo de inmunización murino con vacunas plasmídicas conteniendo el gen PFR1 de *L. infantum*.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Infección experimental, obtención y análisis de órganos

Ratones transgénicos C57BL/6-A2/K^b (expresan el producto del gen quimérico HLA-A2.1/Kb, donde los dominios alfa1 y alfa2 son iguales a los de la molécula HLA-A*201 humana y los dominios alfa3, transmembrana y citoplasmático correspondientes a la molécula murina H-2K^b) como los utilizados en: (Vitiello, Marchesini et al. 1991); fueron infectados con promastigotes de *Leishmania infantum* de la cepa JPC por vía intravenosa (base de la cola) con 10⁶ parásitos cada ratón. Los parásitos provienen del bazo de un perro infectado, se crecieron en medio bifásico NNN y, posteriormente, se pasaron a medio RPMI+20% SFBI, donde se crecieron hasta el comienzo de la fase estacionaria, momento en el que se utilizaron para llevar a cabo la infección. Se hicieron dos grupos de 3 ratones, uno de ellos infectado con la cantidad de parásito antes descrita y al otro grupo se le inyecta PBS.

Los ratones fueron sacrificados por anoxia con CO₂ 170 días post-infección y se les extrajo el bazo y el hígado en condiciones estériles. Estos órganos se utilizaron para determinar la carga parasitaria en cada órgano y para determinar la potencial respuesta citotóxica antígeno-específica generada. Los esplenocitos se obtienen disgregando mecánicamente el bazo, centrifugando y resuspendiendo en 3 ml de solución de lisis de eritrocitos, dejado a temperatura ambiente durante 5 minutos para conseguir la lisis completa de los eritrocitos. Una vez lisados, se centrifuga y las células esplénicas se resuspenden en medio RPMI. Para la obtención de los hepatocitos, se colocan los hígados en 5 ml de medio KRB (154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 5,5 mM glucosa; 20,1 mM HEPES; 25mM NaHCO₃; pH=7,4 con NaOH) con 2 mM de CaCl₂, 2 mM de MgCl₂, colagenasa (500 CDU/ml concentración final) y DNAasa (150 U/ml concentración final) en un tubo C y se disgrega en un *gentleMACS Dissociator* en el programa m-liver_01.02. Tras incubación a 37 °C, 30 minutos en el *MACSmix Tube Rotator*, se ponen los tubos de nuevo en el Dissociator en el programa m_liver_02.02. Una vez finalizado el programa, se pasa por un filtro *cell strainer* (100 µm) y ya se le realiza el mismo tratamiento que a los esplenocitos con la solución de lisis de eritrocitos:

Para llevar a cabo la determinación de la carga parasitaria se cortó una pequeña parte de cada órgano (unos 20 mg del bazo y de unos 60 a 90 mg de hígado). Se homogeneizó cada porción con 1 ml de medio Schneider (con 10% SBF+ 100 unidades /ml de penicilina +0,1 mg/ml de streptomycin) y se hicieron diluciones seriadas 1/3 en una placa de 96 pocillos con el mismo medio por triplicado por cada órgano. La presencia de parásitos vivos en el cultivo a

las distintas diluciones se analizó de forma periódica (cada 48 horas) tras quince días del inicio del cultivo y durante otros quince días.

El análisis de la respuesta citotóxica, se hizo mediante un ensayo ELISPOT granzima B, cuyo protocolo se describe en el apartado 2.5 de la presente memoria.

3.2 Inmunización experimental

Ratones transgénicos C57BL/6-A2/K^b (iguales a los del apartado anterior) fueron inmunizados con diferentes construcciones y sobre el plásmido pCMV4 (pCMV4 PFR1, pCMV4 PFR1-Hsp70 y con el plásmido vector pCMV4 vacío). Los vectores están contruidos mediante digestión del esqueleto del vector y clonando la secuencia de la PFR1 de *L. infantum* en el caso del pCMV4 PFR1 o la secuencia de esta misma PFR1 seguida en su extremo carboxilo por la secuencia de la Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, manteniendo un solo marco de lectura. Los plásmidos transformados en la cepa de *E. coli* XL1-Blue, se obtuvieron con el kit de Maxipreps de Promega. Antes de la inmunización, los plásmidos son filtrados en membranas de 0,22 µm. Se inmunizaron cinco ratones con cada uno de los plásmidos y cuatro controles con solución salina. Las inmunizaciones se llevaron a cabo con 100 µg de DNA (50 µg por cada músculo tibial anterior, por vía intramuscular) en 4 dosis separadas 20 días. Ensayos previos del laboratorio determinaron la correcta expresión de los genes recombinantes clonados en dichos plásmidos (PFR1 y PFR1-Hsp70), mediante análisis por western *blot* de células COS transfectadas con los distintos plásmidos recombinantes a estudio y específicos anticuerpos dirigidos frente a estos antígenos.

3.3 Péptidos

Los péptidos de la proteína PFR1 de *L. infantum* con potencial para unirse a HLA-A*0201 se seleccionaron introduciendo la secuencia de la proteína en una serie de programas *on line* para poder escoger aquellos que en teoría eran más susceptibles de unirse a esta molécula HLA. Los programas utilizados fueron SYFPEITHI¹, RANKPEP² y BIMAS³. Los dos primeros ordenan los péptidos según su afinidad teórica a la molécula HLA-A*0201, y dan una puntuación para cada uno. En cuanto a BIMAS, calcula la vida media teórica del complejo HLA-péptido.

¹ <http://www.syfpeithi.de/home.htm>

² <http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/>

³ http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/

3.3.1 Ensayo de unión a células T2

La capacidad de unión de los péptidos al citado HLA-A*0201 se estudió mediante un ensayo de estabilización de los péptidos a la superficie de células T2 (estas células se cultivaron en medio RPMI 1640+10%SFBI+gentamicina (50 µg/ml)) siguiendo el protocolo descrito en (Valmori, Gervois et al. 1999):

En una placa de 96 pocillos de fondo en U se colocaron $2-4 \times 10^5$ células/pocillo y sobre éstas, cantidades variables (25, 50 y 100 µM) de los péptidos a ensayar por duplicado en un volumen final de 200 µl con medio RPMI 1640+10% SFBI+gentamicina (50 µg/ml). Se utilizó como control positivo el péptido derivado de la envoltura de la hepatitis B HB-ENV₃₃₄₋₃₄₂ de alta afinidad al HLA-A*0201, y como control negativo, las células incubadas en ausencia de péptido. Tras la incubación toda la noche a temperatura ambiente, se lavaron las placas con 200 µl de PBS/pocillo y se cuantificó la presencia del HLA en la superficie de las células utilizando el anticuerpo BB7.2 que es específico de HLA-A*0201, acoplado a PE. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Se adquirieron al menos 5000 células viables utilizando parámetros morfológicos FSC y SSC. Los datos obtenidos por citometría fueron analizados con el programa FlowJo 7.3 y los valores de índice de fluorescencia se calcularon usando la fórmula:

$$\%IE = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia (IF) muestra problema} - \text{IF de C- (sin péptido)}}{\text{IF de C- (sin péptido)}} \times 100$$

3.4 Purificación de la proteína recombinante PFR1

Partiendo de una colonia de *E. coli* M15 trasformada con el plásmido PQE30-PFR1, conteniendo la secuencia correspondiente a la proteína PFR1 de *L. infantum* en fase con una cola de histidinas, se procedió a la inducción de su expresión y a su purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel siguiendo el siguiente protocolo:

Se realizó un preinóculo de la bacteria en medio LB con 100 µg/ml ampicilina y 25 µg/ml kanamicina. Tras incubación toda la noche a 37 °C en agitación, se realizó una dilución 1:50, y se cultivó hasta una densidad óptica de 0,4-0,6 a 600 nm. Se indujo la expresión de la proteína con 0,02 mM IPTG durante tres horas a 37 °C en agitación. El cultivo se centrifugó a 4000 g, 30 minutos y se congeló a -80 °C el sedimento bacteriano obtenido. La solubilización de la proteína se consiguió mediante resuspensión del sedimento bacteriano con tampón de

lisis (tampón fosfato 9 mM pH=8 y NaCl 50 mM) y agitación magnética a 4 °C una hora. Tras sonicación durante cinco minutos y centrifugación media hora a 13000 rpm, el sobrenadante se guardó como primer lisado para su posterior análisis y el precipitado se resuspendió en el mencionado tampón de lisis pero añadiendo SDS al 0,025%, volviéndose a repetir el proceso anteriormente descrito.

Para purificar la proteína recombinante se lavó la resina (NiNTA agarosa) añadiendo a 1 ml de la resina 10 ml de agua bidestilada e incubándola 10 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar 10 minutos a 2000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la resina en 10 ml de tampón de equilibrado (tampón fosfato 50 mM pH=8; NaCl 300 mM y SDS 0,025%), y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de una nueva centrifugación, 10 minutos a 2000 rpm y eliminación del sobrenadante. Esta resina, ya equilibrada, se mezcló con el lisado de proteína seleccionado (previamente, este lisado se ha descongelado y se ha llevado a las mismas condiciones del tampón de equilibrado, añadiendo tampón fosfato y NaCl) y se incubó 3 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se empaquetó la resina en una columna y el lisado se pasó a través de la columna tres veces. Tras lavar con 30 ml de tampón a pH=8 y 30 ml de tampón a pH=7, se tomaron fracciones de 2 ml (dos veces cada una): se tomó 1 fracción de pH=6,5; 4 fracciones de pH=6; 4 de pH=5; y otras 4 de pH=4. Muestras correspondientes a cada una de las etapas se analizaron mediante SDS-PAGE. A las fracciones conteniendo la proteína PFR1 con una pureza superior al 90% se les midió la concentración usando el método Micro BCA Protein Assay Kit de la casa comercial Pierce. La proteína se conservó a -20 °C hasta su uso.

3.5 Determinación de la respuesta citotóxica antígeno específica mediante ensayos de ELISPOT

Para la cuantificación de las células T CD8+ capaces de secretar Granzima B se hizo un ensayo ELISPOT (kit comercial R&D) similar al descrito por (Ewen, Rong *et al.* 2006). Así, la placa de 96 pocillos de PVDF fue prehumedecida con 15 µl/pocillo de etanol 35% durante 1 minuto, tras lo que se lavó la placa tres veces con 200 µl/pocillo de agua estéril. El anticuerpo de captura se añadió en un volumen de 100 µl/pocillo a una dilución 1:100. La incubación de este anticuerpo se realizó durante toda la noche a 4 °C, tras lo que se lavó la placa tres veces con 200 µl/pocillo de PBS. Posteriormente, se llevó a cabo el bloqueo con 200 µl/pocillo de RPMI 1640+10% SFBI+gentamicina (50 µg/ml) durante 2 horas. Una vez finalizado el bloqueo, se descartó el medio y se agregaron $2-4 \cdot 10^6$ células por pocillo (esplenocitos o células no

parenquimales del hígado), en presencia de 1 μ M de cada péptido a ensayar en duplicado. En el caso de los pocillos controles, se incluyeron células en ausencia de péptido (control negativo), o 0,5 μ g/ml PMA e Ionomicina. Las placas se incubaron 48 horas a 37 °C para permitir la unión de la granzima al anticuerpo de captura. Tras la recogida de los sobrenadantes de los pocillos para posteriores determinaciones de IFN γ (ver más adelante), se lavaron las placas 5 veces con 200 μ l/pocillo de PBS y se agregaron 100 μ l/pocillo del anticuerpo de detección biotinilado a una dilución 1:100, dejándolo toda la noche incubando a 4 °C. Tras esta incubación, se hicieron 5 nuevos lavados con 200 μ l/pocillo de PBS y se agregan 100 μ l/pocillo del conjugado enzimático estreptavidina-ALP (Sigma) 1/6000, dejándolo 1 hora a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados con PBS y se agregaron 50 μ l/pocillo de la solución del sustrato (BCIP/NBT liquid, Sigma) y la reacción se detuvo después de una media hora, una vez se considera adecuada la coloración que adquieren los puntos. Cada uno de estos puntos se considera como el revelado de una célula productora de Granzima B. La cuantificación de los puntos se realizó en un microscopio AXIO PLAN 2 Imagine, utilizando el programa KS ELISPOT para analizar los resultados.

3.6 Determinación del nivel de anticuerpos antígeno-específicos mediante la técnica de ELISA

Ensayos ELISA se realizaron para determinar el nivel de anticuerpos generados frente a los antígenos presentes en las moléculas recombinantes usadas como inmunógenos. Así, las placas se fijan con 0,5 μ g/pocillo de PFR1 purificada diluida en tampón carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 0,02 M; NaHCO_3 0,02 M). Tras una noche a 4 °C, las placas se atemperan a 37 °C media hora y se bloquean con PBS+5% leche desnatada (300 μ l/pocillo) durante 2 horas a 37 °C. Tras el bloqueo, se añaden los sueros diluidos en PBS+0,05% Tween+5% leche desnatada a dos diluciones (1/100 y 1/200) y se incuban dos horas a 37 °C en un volumen final por pocillo de 100 μ l. Después de esta incubación, se lavaron las placas con PBS+0,05% Tween, 5 veces y se añadió el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón; anti IgG1 de ratón o anti IgG2a de ratón dependiendo del ensayo y los tres unidos a peroxidasa) diluido en PBS+0,05% Tween+5% leche desnatada. Se incubaba este anticuerpo a 37 °C una hora, se lava con PBS+0,05% de Tween 5 veces y se añade 100 μ l/pocillo de OPD (sustrato, diluido en tampón citrato 0,1 M pH=5), tras lo que se procede a la lectura de la densidad óptica de los pocillos una vez detenida la reacción con H_2SO_4 2 N.

4.- RESULTADOS

4.1 Selección de péptidos con motivo de unión a HLA-A*0201.

Para seleccionar los péptidos susceptibles de unirse a HLA-A*0201 se utilizaron tres programas: SYFPEITHI, RANKPEP y BIMAS. Para ello, se introdujo la secuencia deducida de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* (gene number: AY702344) en cada uno de los programas y se seleccionó el algoritmo de unión a HLA-A*0201. Los dos primeros programas dan una puntuación a cada uno de los péptidos en base a su afinidad teórica a esta molécula HLA. El programa BIMAS puntúa la estabilidad de unión, indicando el tiempo de unión teórico de cada uno de los péptidos a la molécula HLA. En las tablas 1 y 2 se reflejan los péptidos que obtuvieron mejor puntuación:

- Nonámeros:

Posición	SECUENCIA	SYFPEITHI	RANKPEP	BIMAS (min)
165 (1868)	K M M E D <u>I</u> M N A	20	54%	438
186	Q M Q T Q <u>L</u> A Q L	24	64%	35
204 (1869)	A M H D G <u>E</u> T Q V	23	59%	206
222 (1871)	Q L Q E R <u>L</u> I E L	28	68%	201
229	E L L K D <u>K</u> F G L	20	24%	34
395	L V S E G <u>C</u> A G V	21	29%	42
431 (1872)	M L Y L T <u>L</u> G S L	27	64%	35
532	V L T R R <u>S</u> K M V	19	62%	118
538 (1873)	K M V E Y <u>K</u> S H L	22	57%	222

- Decámeros:

Posición	SECUENCIA	SYFPEITHI	RANKPEP	BIMAS (min)
1	M M T P E <u>D</u> A T G L	20	23%	26
103 (1864)	F M D I I <u>G</u> V K K V	24	25%	213
130	Q L I D N <u>S</u> I A K M	25	N.D.	47
150 (1865)	Q L D A T <u>Q</u> L A Q V	26	31%	64
165	K M M E D <u>I</u> M N A T	18	22%	657
222	Q L Q E R <u>L</u> I E L L	26	29%	99
373 (1866)	K L L E L <u>T</u> V Y N C	20	N.D.	606

Tablas 1 y 2. Predicciones teóricas de unión al HLA-A*0201. En negrita y subrayados se señalan los aminoácidos implicados en la unión a la molécula HLA-A*0201. Entre paréntesis se indica la denominación de los péptidos que se sintetizaron.

Combinando los resultados obtenidos, se seleccionaron los ocho mejores péptidos, que fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. O. Noya del Instituto de Medicina Tropical de Caracas (Venezuela). Una vez sintetizados, los péptidos se renombraron con los números 1864 (FMDIIGVKKV), 1865 (QLDATQLAQV), 1866 (KLELTVYNC), 1868 (KMMEDIMNA), 1869 (AMHDGETQV), 1871 (QLQERLIEL), 1872 (MLYLTLGSL) y 1873 (KMVEYKSHL).

4.1.1 Afinidad de unión al HLA-A*0201

Para dilucidar la capacidad de unión de estos péptidos al HLA-A*0201, una vez hecha la síntesis de los mismos tras la predicción *in silico*, se utilizaron células T2 por su deficiencia en la expresión de moléculas transportadoras de antígenos (TAP) (Valmori, Gervois *et al.* 1999). Esta deficiencia hace que exista una menor densidad de moléculas de clase I en su superficie. Las moléculas HLA de clase I son más estables en la superficie de la membrana cuando están asociados a un péptido. Por tanto, cuanto más estable sea la unión del péptido al HLA-A*0201, más densidad del mismo habrá en la membrana celular y, por ende, mayor será la señal que nos dé al marcarlo con un anticuerpo específico para este HLA.

En la figura 3 podemos observar el porcentaje de unión con respecto al péptido control (HB-ENV₃₃₄₋₃₄₂) a una concentración de 50 μ M. En general, todos los péptidos presentaron buena o muy buena unión al HLA-A*0201, siendo en algunos casos superior al del propio péptido control.

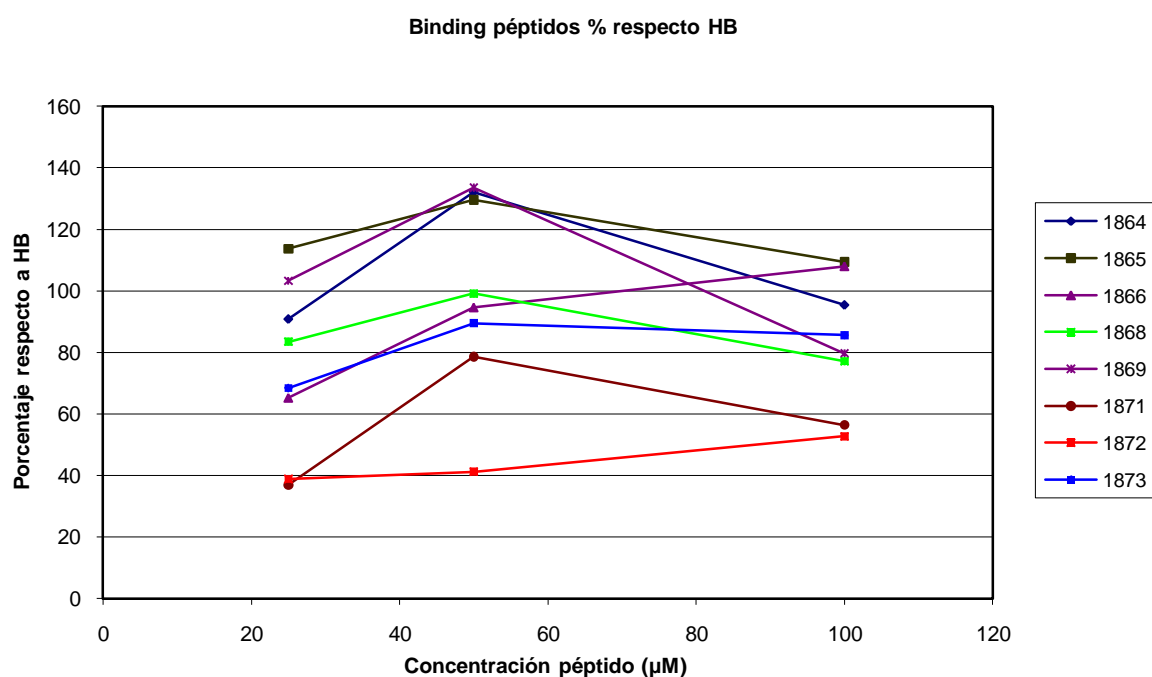


Figura 3. Porcentaje de unión a células T2 de los diferentes péptidos de la proteína PFR1 de *L. infantum*. Valores referidos al péptido control (HB-ENV₃₃₄₋₃₄₂).

4.2 Inmunización experimental de ratones A2/K^b

Se llevó a cabo la inmunización experimental de ratones transgénicos A2/K^b con los plásmidos pCMV4 PFR1 y pCMV4 PFR1 Hsp70.

4.2.1 Purificación plásmidos para inmunizaciones

Utilizando el kit comercial de Promega, se purificaron los plásmidos transformados en la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Una vez analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 4), el DNA fue pasado a través de un filtro de 22 µm para su esterilización antes de proceder a la inmunización.

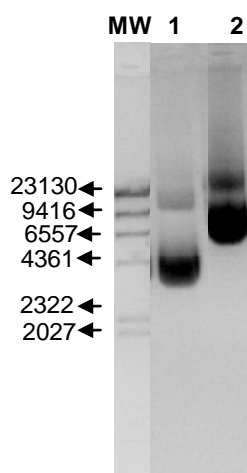


Figura 4. Imagen del gel de agarosa al 1% obtenido con las maxipreps de los plásmidos. **MW.** Marcador de peso molecular (λ -Hind III) **1.** pCMV4 PFR1 **2.** pCMV4 PFR1-Hsp70

4.2.2 Expresión y purificación de la proteína PFR1 de *L. infantum*

Tal y como queda indicado en el apartado de material y métodos, la proteína PFR1 se purificó utilizando una colonia de *E. coli* M15 transformada con el plásmido PQE30-PFR1. Inicialmente, se procedió a inducir la expresión de la proteína PFR1 en un cultivo de la citada bacteria recombinante, así como a la extracción de las proteínas totales de la misma. En la figura 5 mostramos el homogeneizado de las proteínas totales de las mencionadas bacterias transformadas con el gen codificante para la proteína PFR1 de *L. infantum* tras su inducción, teñidas por azul Coomassie (panel izquierdo), así como el *western blot* de dichas proteínas usando como anticuerpo un monoclonal anti-His (panel derecho).

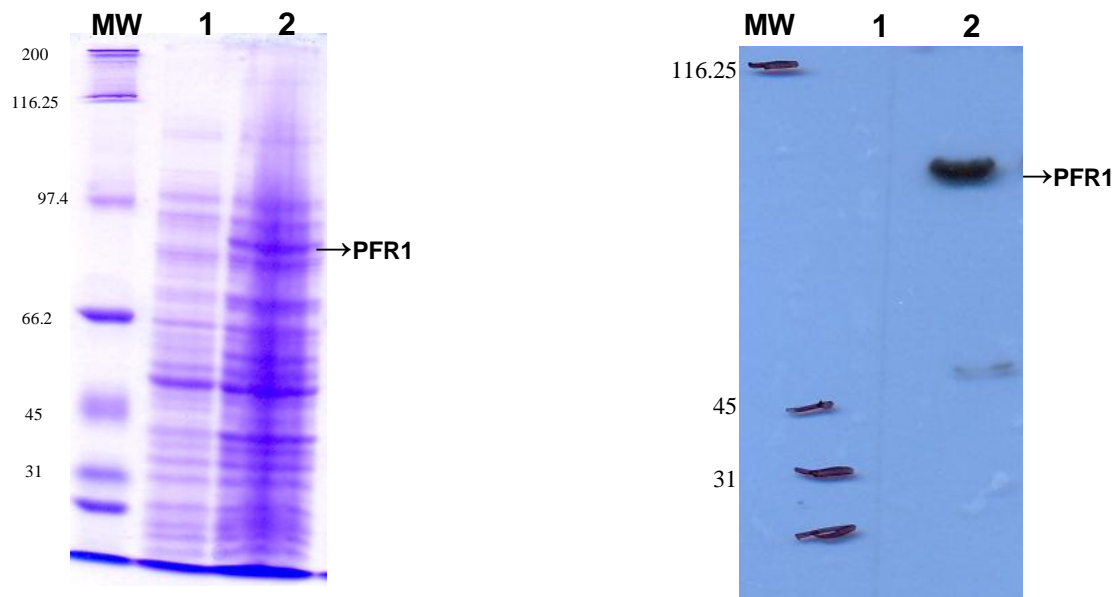


Figura 5. (Panel izquierdo) Gel de Acrilamida al 10% SDS-PAGE de homogeneizado de proteína totales de bacterias transformadas con el gen *PFR1* de *L. infantum*. **MW.** Marcador de peso molecular **1.** Cultivo no Inducido; **2.** Cultivo inducido con IPTG. **(Panel derecho)** Imagen de *Western blot* de las proteínas desarrolladas en el gel mostrado en panel izquierdo, inmovilizadas sobre Nylon e hibridadas con un anticuerpo monoclonal anti-His. **MW.** Marcador de peso molecular **1.** Cultivo no Inducido; **2.** Cultivo inducido.

Tras la inducción de la proteína recombinante, se procedió a establecer las mejores condiciones de solubilización (imágenes no mostradas). Una vez comprobada la eficiencia de dicha solubilización, se procedió a la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad, tal como se describe con anterioridad. Las fracciones más ricas en la proteína recombinante PFR1 a estudio aparecen representadas en la figura 6.

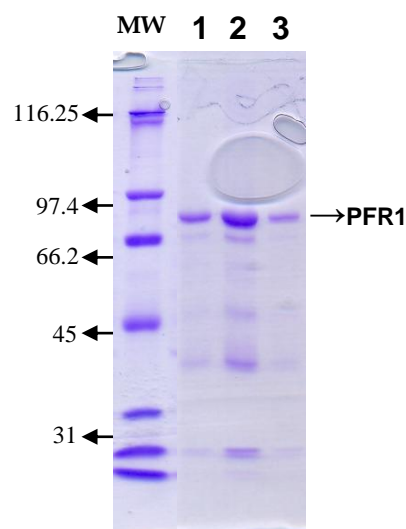


Figura 6. Gel de Acrilamida (10%) SDS-PAGE correspondiente a la purificación de la PFR1 de *L. infantum*. En la foto: **MW.** Marcador de peso molecular **1.** Fracción pH=6,5; **2.** Fracción 1 pH=6; **3.** Fracción 2 pH=6

En todos los geles representados, la proteína PFR1 se corresponde con la banda más intensa localizada por encima de la banda del marcador de 66,2 kDa, lo cual estaría de acuerdo con el tamaño teórico de la mencionada proteína (70 kDa). Las fracciones correspondientes a la resina, así como aquellas obtenidas tras los diferentes lavados no muestran la presencia de banda alguna de tamaño similar a la que se correspondería con la proteína PFR1 (figura no mostrada).

4.2.3 Respuesta humoral en ratones A2/K^b inmunizados

De los ratones inmunizados descritos en el apartado materiales y métodos, se obtuvo suero 15 días post 4^º inmunización y en el momento del sacrificio de los mismos que fue 6 semanas post 4^º inmunización (se sacrificaron tres ratones de cada grupo).

La respuesta humoral inducida tras la inmunización se cuantificó mediante la realización de ensayos ELISA frente a la proteína PFR1 de *L. infantum* con los sueros de estos ratones. Se midieron no solamente los niveles de IgG, sino también los isotipos IgG1 e IgG2a.

En la figura 7 podemos observar los niveles de IgG frente a la PFR1 de los diferentes ratones, observando cómo entre 14 y 40 días post 4^º inmunización los niveles de anticuerpos anti-PFR1 se reducen en todos los casos, aunque no con la misma intensidad.

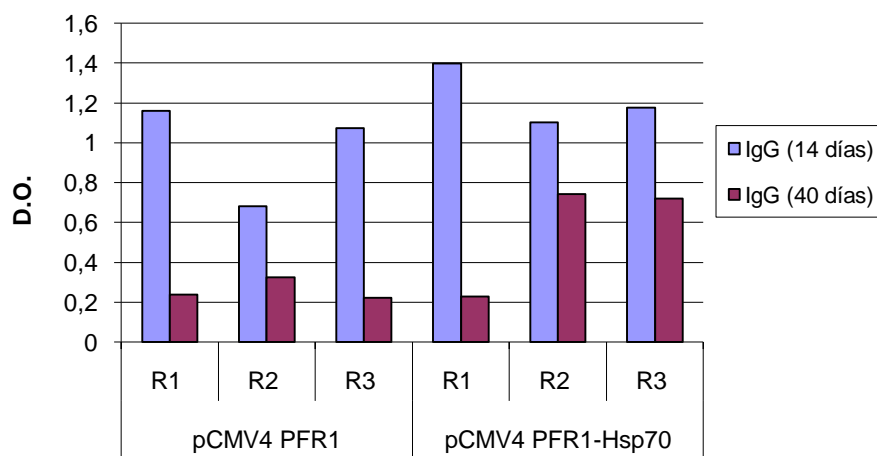


Figura 7. Variación en los niveles de IgG entre 14 y 40 días post 4^º inmunización a dilución 1/200.

En la figura 8 mostramos los niveles de IgG1 e IgG2a frente a la PFR1 de los diferentes ratones a 14 y 40 días post 4ª inmunización.

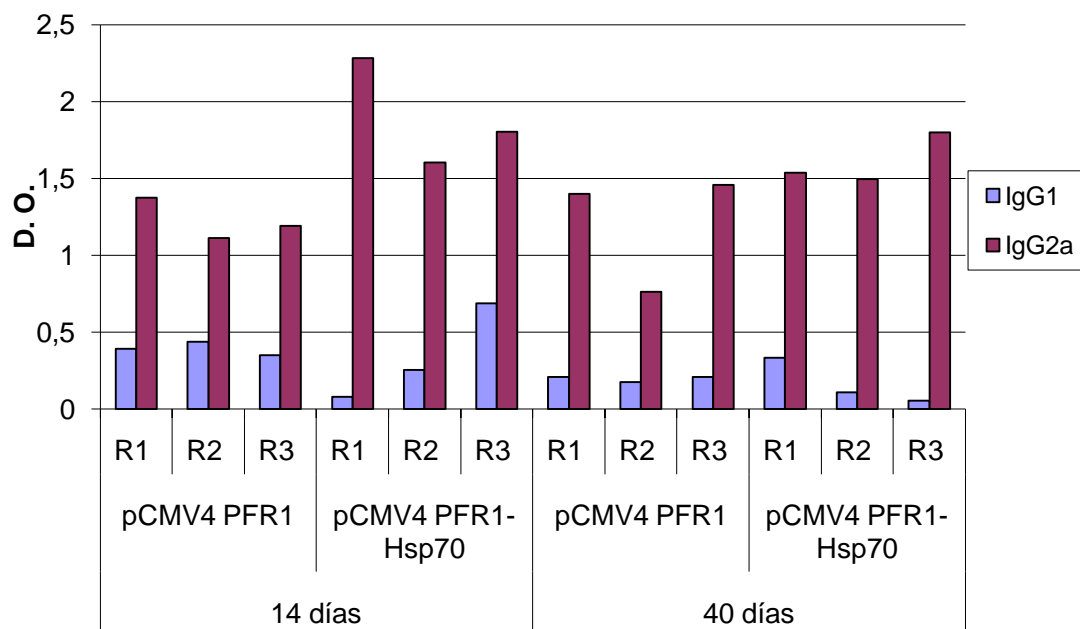


Figura 8. Nivel de anticuerpos de los ratones 14 días post 4ª inmunización determinado a dilución 1/200. La densidad óptica de los sueros de los ratones a los que se inyectó solución salina sirve de control negativo para el ensayo y su densidad óptica se resta a los demás valores.

Como podemos deducir de los anteriores gráficos, la respuesta humoral antígeno-específica generada frente a la proteína PFR1 en los ratones inmunizados con los plásmidos recombinantes está claramente polarizada hacia el subtipo IgG2a. Además, podemos observar que los niveles de IgG son ligeramente superiores y algo más estables en el tiempo en los ratones inmunizados con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70 que en los pCMV4 PFR1.

4.2.4 Respuesta CTL en ratones A2/K^b inmunizados

Con los mismos ratones del apartado anterior, una vez sacrificados a las 6 semanas post 4ª inmunización, sus esplenocitos fueron expuestos a los distintos péptidos en un ensayo ELISPOT con un anticuerpo detector de Granzima B. Se consideró que la respuesta es positiva cuando se contaron más del doble de puntos que los pocillos del control negativo (expuestos al RPMI sin ningún péptido) con una diferencia mínima entre ambos pocillos de 75 puntos. Los valores obtenidos en cada caso quedan representados en la figura 9.

	S. salina			pCMV4 PFR1			pCMV4 PFR1-Hsp70		
Péptido	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1864	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1865	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1866	-	-	-	-	-	-	-	-	108
1868	-	-	-	-	-	-	-	-	97
1869	-	-	-	-	-	-	-	-	113
1871	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1872	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1873	-	-	-	-	-	-	-	-	111

Figura 9. Representación de los resultados obtenidos en el ensayo ELISPOT (tres controles, *S. Salina*; y seis inmunizados, *pCMV4 PFR1* y *pCMV4 PFR1-Hsp70*). Los números representados se obtienen restando los puntos obtenidos en cada pocillo menos los obtenidos en el control negativo (fondo). En los pocillos negativos no se representa el valor correspondiente.

Los resultados obtenidos en el ensayo de ELISPOT muestran cómo resultan positivos los pocillos correspondientes a los péptidos 1866, 1868, 1869 y 1873 en el ratón 3 inmunizado con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70.

4.3 Infección experimental de ratones A2/K^b

Se llevó a cabo la infección de tres ratones transgénicos A2/K^b con 10⁶ parásitos por vía intravenosa tal y como está descrito en la sección materiales y métodos. Los ratones fueron sacrificados a los 170 días post infección junto con tres ratones control a los que se les inyectó PBS por la misma vía en la misma fecha de la infección.

4.3.1 Carga parasitaria en ratones infectados

Tal y como se describe en el apartado de material y métodos, los órganos de los ratones infectados se utilizaron para analizar la carga parasitaria en cada uno de ellos. A la vista de las placas resultantes, sólo se vio presencia parasitaria en el bazo del ratón 2 que presentó una carga parasitaria superior a los 2 x 10³ parásitos/mg bazo (Figura no mostrada).

4.3.2 Respuesta CTL en ratones A2/K^b infectados

Para determinar si los péptidos seleccionados por su mayor índice de unión a la molécula HLA son presentados a los linfocitos CD8⁺ en el curso de la infección por *L. infantum*,

se obtuvieron los esplenocitos y las células no parenquimales del hígado de cada uno de los seis ratones sacrificados y se expusieron a cada uno de los ocho péptidos en el contexto del ensayo ELISPOT de Granzima B, similar al anteriormente descrito para los ratones inmunizados. Se volvió a considerar positivo todo pocillo en el que se contaran más del doble de puntos del control negativo, con una diferencia mínima entre ambos de 75 puntos. En las figuras 10 y 11 podemos ver que los péptidos 1871, 1872 y 1873 son reconocidos por los linfocitos CD8+ y son, por tanto, capaces de generar respuesta positiva de Granzima B tanto en bazo como en hígado de, al menos, uno de los ratones infectados.

Péptido	No Infectados			Infectados		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1864	-	-	-	-	-	-
1865	-	-	-	-	-	-
1866	-	-	-	-	-	-
1868	-	-	-	-	-	-
1869	-	-	-	-	-	-
1871	-	-	-	-	-	94
1872	-	-	-	-	84	98
1873	-	-	-	-	-	117

Figura 10 (bazos). Resumen del resultado del ensayo ELISPOT de Granzima B utilizando esplenocitos de los ratones infectados y controles. Los números se obtienen restando los puntos de cada uno de los pocillos menos el valor del control negativo (esplenocitos sin presencia de antígeno). En los pocillos negativos, no se representa el valor.

Péptido	No Infectados			Infectados		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1864	-	-	-	-	-	-
1865	-	-	-	-	-	-
1866	-	-	-	-	-	-
1868	-	-	-	-	-	-
1869	-	-	-	-	-	-
1871	-	-	-	104	-	-
1872	-	-	-	87	-	-
1873	-	108	83	98	102	-

Figura 11 (hígados). Resumen del resultado del ensayo ELISPOT de Granzima B utilizando células no parenquimales del hígado de los ratones infectados y controles. Los números se obtienen restando los puntos de cada uno de los pocillos menos el valor del control negativo (células sin antígeno). En los pocillos negativos, no se representa el valor.

5.- DISCUSIÓN

Una de las limitaciones en el diseño de inmunoterapias basadas en la inducción de una respuesta CD8 específica de antígeno es el alto grado de polimorfismo de las moléculas de HLA de clase I. Pese a este hecho, se estima que alrededor de la mitad de la población mundial expresa HLA-A*0201, incluyendo las zonas endémicas para *Leishmania* (Sette and Sidney 1999), lo que justifica el interés de la caracterización de epítopes restringidos a esa molécula presentadora. En este estudio la predicción de péptidos con motivos de unión a este HLA se realizó combinando diferentes algoritmos. Esta combinación resultó bastante acertada, puesto que todos los péptidos seleccionados mostraron valores altos de unión a la mencionada molécula y/o de estabilidad de dicha unión, superando en algunos casos al propio control positivo. Estudios de otros autores sugieren una relación entre la afinidad de unión por el HLA de clase I y su inmunogenicidad (Sette, Vitiello et al. 1994).

Los ratones transgénicos C57BL/6-A2K^b usados en el presente estudio resultan de una gran utilidad para la predicción de epítopes CD8, ya que se ha descrito un alto solapamiento del repertorio TcR restringido a HLA-A2 entre este modelo animal y el hombre (Wentworth, Vitiello et al. 1996). Los resultados obtenidos en la infección experimental con *Leishmania infantum* indican que, efectivamente, los péptidos 1871, 1872 y 1873 son presentados de forma eficaz durante el curso de la infección en, al menos, uno de los tres ratones infectados. No obstante, los resultados obtenidos con las células no parenquimales del hígado de estos ratones, no son del todo concluyentes porque, si bien los péptidos 1871, 1872 y 1873 vuelven a ser reconocidos por los ratones infectados, el péptido 1873 activa la secreción positiva de Granzima B en dos ratones control. Por tanto, estimamos que para este péptido sería necesario repetir el experimento con un mayor número de ratones para comprobar si la tasa de reconocimiento es o no específica de los ratones infectados. Asimismo, está prevista la determinación de IFN γ en los sobrenadantes obtenidos en los ensayos ELISPOT como prueba confirmatoria de la estimulación de linfocitos T específicos. Es interesante señalar que los péptidos que son capaces de generar respuesta positiva de Granzima B en estos ratones infectados son los que peor resultado arrojaban en los ensayos de unión, lo que demuestra que, si bien es necesaria la formación de un complejo HLA-péptido estable, no existe una correlación directa entre la estabilidad de la unión y la inmunogenicidad del péptido en todos los casos.

Para saber si estos epítopes son inmunogénicos en el contexto de una vacunación, se inmunizaron ratones C57BL/6-A2/K^b con distintos plásmidos portadores del gen codificante para la proteína PFR1 de *L. infantum* en forma aislada o asociada al gen codificante para la

Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, el cual ha mostrado en previos estudios capacidad adyuvante (Planelles et al., 2001, Morell et al., 2006). Con respecto a la respuesta humoral específica de estos ratones frente a la PFR1, se observó una clara polarización hacia el isotipo IgG2a, lo que es deseable en la búsqueda de una vacuna eficaz contra esta enfermedad (Bourdoiseau, Hugnet et al. 2009). Además, la inmunización con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70 genera una respuesta humoral claramente superior y más duradera que la generada por el pCMV4 PFR1. Estos resultados están en consonancia con aquellos ya descritos, en los que se utilizó plásmidos conteniendo el gen KMP11 de *T. cruzi* en forma aislada o asociado al gen Hsp70 (Planelles et al., 2001). Igualmente, sólo se detectaron respuestas específicas para epítopes restringidos a HLA-A*0201 en los esplenocitos de ratones inmunizados con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70, que reconocieron los péptidos 1866, 1868, 1869 y 1873. Como podemos ver, los péptidos reconocidos son diferentes a los que se detectaron en el ensayo de infección experimental, evidenciando que el contexto inmunológico es diferente. Sólo el péptido 1873 se repite como uno de los activadores. Por otra parte, este ensayo permite comprobar que los plásmidos vacuna usados como inmunógenos están siendo eficientemente transcritos y traducidos, siendo algunos de sus dominios peptídicos presentados a los linfocitos CD8+, activándolos de forma antígeno-específica.

En resumen, podemos decir que los resultados de este estudio son prometedores porque nos han permitido identificar en la proteína PFR1 de *L. infantum* varios epítopes CTLs (probablemente CD8+) que son potencialmente susceptibles de ser reconocidos por los pacientes con leishmaniosis. Asimismo, los estudios realizados han evidenciado la eficacia de la inmunización con plásmidos portadores del gen codificante para la proteína PFR1 de *L. infantum*, asociado al de la proteína Hsp70 como adyuvante, para inducir respuestas inmunes efectoras antígeno-específicas, tanto de anticuerpos como de CTLs.

6. CONCLUSIONES

1.- Se ha determinado la existencia de cinco epítopes reconocidos por los linfocitos T con actividad citotóxica (CTLs) en la secuencia de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum*. Dos de estos epítopes han sido identificados en el contexto de la infección experimental murina (ratones C57BL/6-A2K^b) con *L. infantum* (péptidos 1871 y 1872) y tres tras la inmunización de ratones de dicha cepa con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70 (péptidos 1866, 1868 y 1869).

2.- Se caracterizó la respuesta humoral específica frente a la proteína PFR1 en ratones inmunizados con dos construcciones plasmídicas diferentes (pCMV4 PFR1 y pCMV4 PFR1-Hsp70), observando la superior y más duradera respuesta de anticuerpos en los ratones inmunizados con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70. Asimismo, se observó que con ambos plásmidos la respuesta IgG antígeno específica inducida está claramente desbalanceada hacia el isotipo IgG2a.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, J. and D. G. Russell (1992). "The interaction of leishmania species with macrophages." Advances in Parasitology **31**: 175-254.
- Alvar, J., S. Yactayo, et al. (2006). "Leishmaniosis and poverty." Trends in Parasitology **22**(12): 552-557.
- Bourdoiseau, G., C. Hugnet, et al. (2009). "Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs." Veterinary Immunology and Immunopathology **128**(1-3): 71-78.
- Carrillo, E. and J. Moreno (2009). "Cytokine profiles in canine visceral leishmaniosis." Veterinary Immunology and Immunopathology **128**(1-3): 67-70.
- Carson, C., R. J. Quinnell, et al. (2010). "Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum* naturally infected dogs." Veterinary Immunology and Immunopathology **133**(2-4): 264-268.
- Carter, K. C., F. L. Henriquez, et al. (2007). "DNA vaccination against the parasite enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase confers protection against *Leishmania donovani* infection." Vaccine **25**(22): 4502-4509.
- Coutinho, S. G., M. P. Oliveira, et al. (1996). "T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniosis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: Immunologic patterns associated with cure." Experimental Parasitology **84**(2): 144-155.
- Cunningham, A. C. (2002). "Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*." Experimental and Molecular Pathology **72**(2): 132-141.
- Chappuis, F., S. Sundar, et al. (2007). "Visceral leishmaniosis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nature Reviews Microbiology **5**(11): 873-882.
- Ewen, C. L., J. Rong, et al. (2006). "Evaluating antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses by a novel mouse granzyme B ELISPOT assay." Journal of Immunological Methods **308**(1-2): 156-166.
- Ghosh, A., W. W. Zhang, et al. (2001). "Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections." Vaccine **20**(1-2): 59-66.
- Gurunathan, S., C. Prussin, et al. (1998). "Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection." Nature Medicine **4**(12): 1409-1415.
- Handman, E. (1999). "Cell biology of *Leishmania*." Advances in Parasitology **44**: 39.
- Hartmann, G., G. J. Weiner, et al. (1999). "CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(16): 9305-9310.
- Herwaldt, B. L. (1999). "Miltefosine--the long-awaited therapy for visceral leishmaniosis?" N Engl J Med **341**(24): 1840-1842.
- Jakob, T., P. S. Walker, et al. (1998). "Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: A role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA." Journal of Immunology **161**(6): 3042-3049.
- Joshi, T., S. Rodriguez, et al. (2009). "B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections." PLoS Pathogens **5**(5).

- Kane, M. M. and D. M. Mosser (2001). "The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniosis." Journal of Immunology **166**(2): 1141-1147.
- Kaye, P. M., M. Svensson, et al. (2004). "The immunopathology of experimental visceral leishmaniosis." Immunol Rev **201**: 239-253.
- Kedzierski, L., Y. Zhu, et al. (2006). "Leishmania vaccines: Progress and problems." Parasitology **133**(SUPPL.2).
- Maga, J. A. and J. H. LeBowitz (1999). "Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod." Trends in Cell Biology **9**(10): 409-413.
- McMahon-Pratt, D. and J. Alexander (2004). "Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease?" Immunological Reviews **201**: 206-224.
- Melby, P. C., G. B. Ogden, et al. (2000). "Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniosis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library." Infection and Immunity **68**(10): 5595-5602.
- Melby, P. C., J. Yang, et al. (2001). "Leishmania donovani p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniosis." Infection and Immunity **69**(8): 4719-4725.
- Méndez, S., Y. Belkaid, et al. (2002). "Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniosis." Vaccine **20**(31-32): 3702-3708.
- Minodier, P., R. Piarroux, et al. (1999). "Pathophysiology of mediterranean visceral leishmaniosis." Leishmaniose viscerale mediterraneenne: Physiopathologie **28**(1): 33-39.
- Morell, M., M. C. Thomas, et al. (2006). "The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late Trypanosoma cruzi infection." Vaccine **24**(49-50): 7046-7055.
- Piscopo, T. V. and C. M. Azzopardi (2007). "Leishmaniosis." Postgraduate medical journal **83**(976): 649-657.
- Planelles, L., M. C. Thomas et al. (2001). "DNA immunization with Trypanosoma cruzi HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection". Infection and Immunity **69**(10): 6558-6563.
- Rafati, S., A. Kariminia, et al. (2002). "Recombinant cysteine proteinases-based vaccines against Leishmania major in BALB/c mice: The partial protection relies on interferon gamma producing CD8+ T lymphocyte activation." Vaccine **20**(19-20): 2439-2447.
- Ramos, I., A. Alonso, et al. (2008). "Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response". Vaccine **26**(3): 333-344.
- Ready, P. D. (2010). "Leishmaniasis emergence in Europe". Euro Surveill. **15**(10)
- Rodríguez-Cortés, A., A. Ojeda, et al. (2007). "Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against Leishmania infantum experimental challenge." Vaccine **25**(46): 7962-7971.
- Rosa, R., C. Marques, et al. (2007). "Immunization with Leishmania infantum released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response". Vaccine **25**(23): 4525-4532.
- Sacks, D. and C. Anderson (2004). "Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice." Immunological Reviews **201**: 225-238.

- Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." Nature Reviews Immunology **2**(11): 845-858.
- Saravia, N. G., M. H. Hazbón, et al. (2005). "Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*." Vaccine **23**(8): 984-995.
- Sette, A. and J. Sidney (1999). "Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism." Immunogenetics **50**(3-4): 201-212.
- Sette, A., A. Vitiello, et al. (1994). "The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes." Journal of Immunology **153**(12): 5586-5592.
- Smith, D. F., L. Whitesell, et al. (1998). "Molecular chaperones. Biology and prospects for pharmacological intervention." Pharmacological Reviews **50**(4): 493-513.
- Sparwasser, T., E. S. Koch, et al. (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." European Journal of Immunology **28**(6): 2045-2054.
- Stanley, A. C. and C. R. Engwerda (2007). "Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis." Immunology and Cell Biology **85**(2): 138-147.
- Thomas, M. C., J. L. García-Pérez, et al. (2000). "Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: A cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level." DNA and Cell Biology **19**(1): 47-57.
- Thomas, M. C., M. Olivares, et al. (2000). "Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*." Acta Tropica **75**(2): 203-210.
- Uzonna, J. E., K. L. Joyce, et al. (2004). "Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon γ -producing CD8⁺ T cells." Journal of Experimental Medicine **199**(11): 1559-1566.
- Valmori, D., N. Gervois, et al. (1999). "Erratum: Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A*0201- restricted CTI. Specific for the Immunodominant Melan-A/MART-1. Antigenic peptide (Journal of Immunology (1998) 161 (6956-6962))." Journal of Immunology **163**(2): 1093.
- Vitiello, A., D. Marchesini, et al. (1991). "Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex." Journal of Experimental Medicine **173**(4): 1007-1015.
- Wentworth, P. A., A. Vitiello, et al. (1996). "Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice." European Journal of Immunology **26**(1): 97-101.
- Woodland, D. L. and R. W. Dutton (2003). "Heterogeneity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells." Current Opinion in Immunology **15**(3): 336-342.
- Wrightsmann, R. A., K. A. Luhrs, et al. (2002). "Paraflagellar rod protein-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes target *trypanosoma cruzi*-infected host cells." Parasite Immunology **24**(8): 401-412.

